

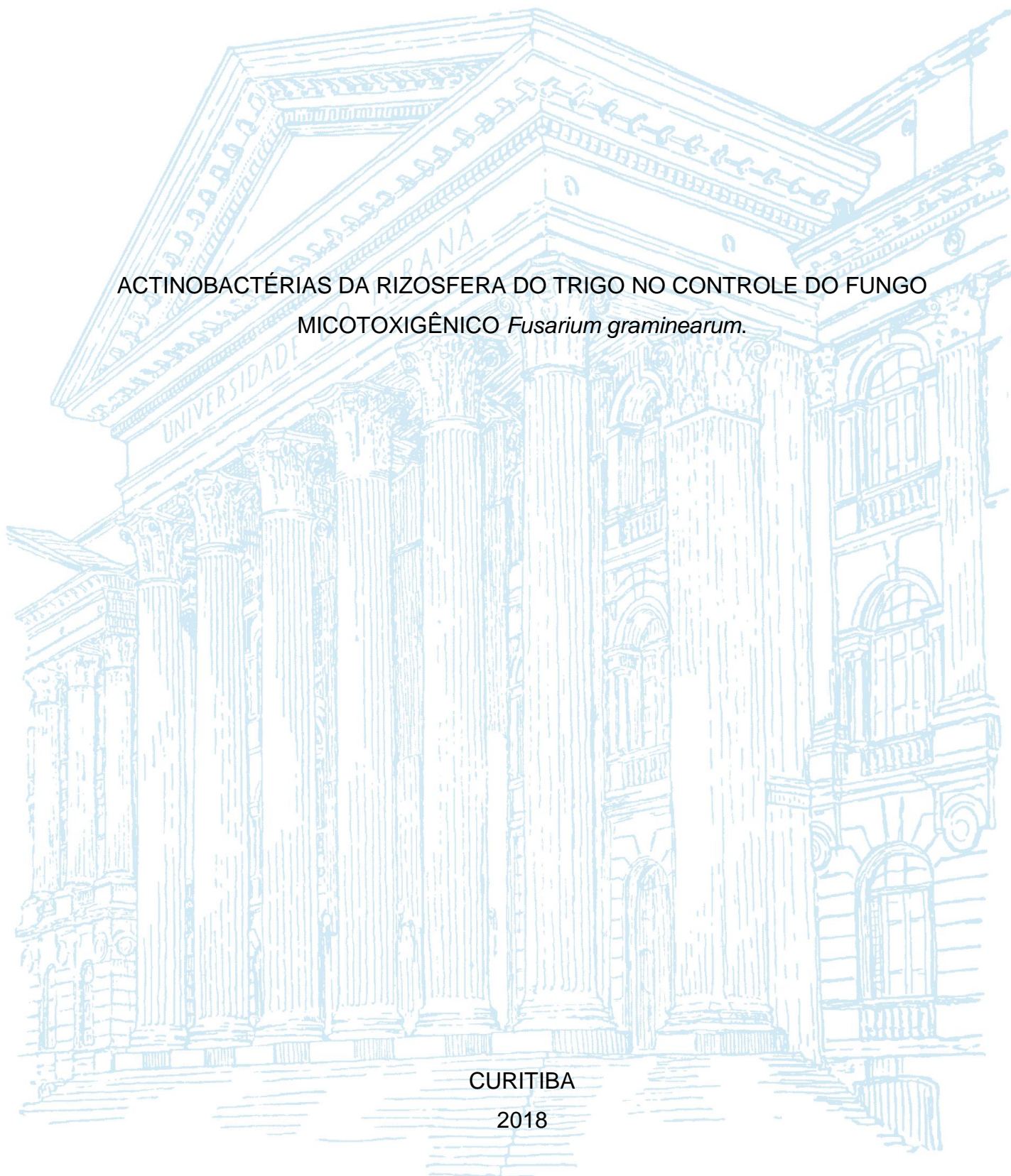
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TACIANY CAMPOS DE LIMA

ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DO TRIGO NO CONTROLE DO FUNGO
MICOTOXIGÊNICO *Fusarium graminearum*.

CURITIBA

2018



TACIANY CAMPOS DE LIMA

ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DO TRIGO NO CONTROLE DO FUNGO
MICOTOXIGÊNICO *Fusarium graminearum*.

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel, curso de Bacharel
em Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel
Coorientadora: Dr^a. Sabina Moser Tralamazza

CURITIBA

2018

Dedico,

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus familiares que estiveram sempre ao meu lado em toda a minha
caminhada.

Em especial aos meus pais, Nadia e Wilson, minha querida irmã, Livia, minha tia,
Bete e meu amado marido, Vagner.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profª Drª Ida Chapaval Pimentel, pelos conselhos, ensinamentos e por ter confiado em mim.

À Drª Sabina Mozer Tralamazza e Carolina Poitevin que tanto me ajudaram neste trabalho.

À todos os professores que contribuíram para meu desenvolvimento profissional e processo de formação acadêmica.

À todos os colegas de laboratório, que me ajudaram e auxiliaram durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais, Nadia e Wilson, minha querida irmã, Livia, minha tia, Bete e meu amado marido, Vagner, que me apoiaram em todos os momentos e acreditaram em meu potencial.

Ao Vagner novamente, pelo amor, apoio, paciência e por estar comigo todos os dias nessa jornada.

*Disse a flor para o Pequeno Príncipe: “É preciso que eu suporte duas
ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O trigo no Brasil vem recebendo mais atenção para melhorar sua qualidade tecnológica e sanitária, isso porque a qualidade do trigo nacional é inferior ao internacional. A giberela é uma doença floral causada pelo fungo *Fusarium graminearum* que afeta a qualidade dos grãos em geral, além de produzir micotoxinas que são nocivas à saúde humana e animal. Para tentar conter a doença é comum a utilização de fungicidas, porém, há uma demanda mundial em reduzir o uso de químicos, visto que estes podem causar danos ao meio ambiente e se tornarem obsoletos devido ao constante surgimento de micro-organismos resistentes aos agentes químicos. Assim, têm-se procurado novas técnicas para o controle de organismos patogênicos, como o controle biológico, que utiliza outros organismos para controlar o aparecimento de patógenos. Devido à alta diversidade e capacidade de produção metabólica, actinobactérias apresentam um grande potencial exploratório como controle biológico. Assim, neste trabalho foi realizado o isolamento de actinobactérias da rizosfera de plantas de trigo e avaliado a sua capacidade de inibir o fungo micotoxigênico *Fusarium graminearum*, causador da giberela. Para o isolamento dos micro-organismos, foram coletadas em um plantio de trigo na cidade de Cascavel, Paraná, 20 amostras de solo, na região da rizosfera. Estas, foram diluídas e inoculadas em meio de cultura WYE por 7 dias. Após o isolamento, a identificação das actinobactérias foi realizada através da macromorfologia e por coloração de Gram. Do total, 29 actinobactérias foram selecionadas para avaliar seu potencial de inibir a espécie *F. graminearum*. Em seguida, os quatro isolados com maior potencial foram cultivados em caldo YM por 14 dias e seus extratos foram testados contra três linhagens de *F. graminearum* (29287, 31FP e 66048) através da técnica de microdiluição. No total, foram isolados 255 microrganismos, dos quais 87 foram confirmados serem actinobactérias tanto pela macromorfologia, como pela micromorfologia. No teste de inibição, foram encontrados 8 isolados com alta capacidade inibitória frente ao fungo. Destes, os isolados Cz91, Gy04, Cz201 e Cz122 se destacaram por inibir 69%, 56%, 47% e 38% do crescimento de *F. graminearum*, respectivamente e foram escolhidos para o cultivo dos metabólitos. Todos os extratos apresentaram algum grau de inibição, o extrato de Cz201 se destacou por inibir 78%, 96% e 89% do crescimento das cepas 31FP, 66048 e 29287 respectivamente. Para a cepa 31FP, o extrato Cz91 foi o qual inibiu mais, diminuindo 84% do crescimento. Esses resultados demonstraram que as actinobactérias isoladas do solo apresentam um grande potencial biotecnológico contra fungos fitopatogênicos como *F. graminearum*.

Palavras-chave: Micotoxina, microdiluição, inibição, metabólitos, giberela.

ABSTRACT

In Brazil, wheat has been receiving more attention to improve its technological and sanitary quality, because of the national wheat quality is inferior compared to international ones. Giberela is a floral disease caused by the fungus *Fusarium graminearum*, it affects the quality of the grains in general, besides produces mycotoxins that are harmful to human and animal health. The use of fungicides is common to try to contain the disease, however, there is a global demand to reduce the use of chemicals, because they can cause damage to the environment and become obsolete due to the constant emergence of microorganisms resistant to chemical agents. Thus, new techniques have been sought for the control of pathogenic organisms, such as biological control, which uses other organisms to control the appearance of pathogens. Due to the high diversity and capacity of metabolic production, actinobacteria present a great exploratory potential as biological control. Thus, in this work actinobacteria from the rhizosphere of wheat plants was isolated and its ability to inhibit the mycotoxigenic fungus *Fusarium graminearum*, responsible to cause giberela, was evaluated. For the isolation of the microorganisms, 20 soil samples were collected from a wheat plantation in the city of Cascavél, Paraná, from the rhizosphere region. These ones, were diluted and inoculated in WYE culture medium for 7 days. After isolation, the identification of actinobacteria was performed through macromorphology and Gram staining. Of the total, 29 actinobacteria were selected to evaluate their potential to inhibit the *F. graminearum* species. Then, the four isolates with the highest potential were grown in YM broth for 14 days and their extracts were tested against three strains of *F. graminearum* (29287, 31FP and 66048) using the microdilution technique. In total, 255 microorganisms were isolated, of which 87 were confirmed to be actinobacteria by both macromorphology and micromorphology. In the inhibition test, 8 isolates with high inhibitory capacity against the fungus were found. Of these, isolates Cz91, Gy04, Cz201 and Cz122 were distinguished by inhibiting 69%, 56%, 47% and 38% of the growth of *F. graminearum*, respectively and were chosen for the cultivation of the metabolites. All extracts showed some degree of inhibition, the Cz201 extract was highlighted by inhibiting 78%, 96% and 89% growth of the 31FP, 66048 and 29287 strains respectively. For the 31FP strain, the Cz91 extract was the best, decreasing 84% fungus growth. These results demonstrated that the actinobacteria isolated from the soil present a great biotechnological potential against phytopathogenic fungi like *F. graminearum*.

Keywords: Mycotoxin, microdilution, inhibition, metabolites, Giberela.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PLACAS DE PETRI COM MEIO WYE INOCULADAS COM GRÃOS DE TRIGO A 28°C (ESQUERDA) E 37°C (DIREITA) POR 5 DIAS	35
FIGURA 2 – MACROMORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE ACTINOBACTÉRIAS CRESCIDAS EM MEIO CZAPEK DOX, A 37°C, DURANTE ATÉ 14 DIAS.....	35
FIGURA 3 – MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS A - GY04, B - CZ91, C - CZ122, D - CZ201 CORADAS EM GRAM (AUMENTO 1000X).....	36
FIGURA 4 – MODELO DE TESTE DE INIBIÇÃO (MÉTODO ADAPTADO DE CAFARO E CURRIE, 2005)	37
FIGURA 5 –TESTE DE INIBIÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS CONTRA O ISOLADO DE <i>F. graminearum</i> PARA AS QUATRO MAIORES INIBIÇÕES EM MEIO DE CULTURA YM, APÓS 8 DIAS A 28°C	40
FIGURA 6 – TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE <i>F. Graminearum</i> , 31FP, 66048 E 28287, PELO EXTRATO DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> UTILIZADOS no estudo.....	28
TABELA 2 – MEIO DE CULTURA ÁGAR-AMIDO-CASEÍNA (AAC)	28
TABELA 3 – MEIO DE CULTURA WATER YEAST EXTRACT (WYE)	29
TABELA 4 – MEIO DE CULTURA GLUCOSE YEAST (GY)	29
TABELA 5 – MEIO DE CULTURA CZAPEK DOX.....	29
TABELA 6 – MEIO DE CULTURA YEAST MALT (YM).....	29
TABELA 7– MEIO DE CULTURA BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA) KASVI®	29
TABELA 8 – MEIO DE CULTURA SYNTHETIC NUTRIENT AGAR (SNA)	30
TABELA 9 – ÁGUA PEPTONADA 0,1%	30
TABELA 10 – CALDO YM.....	30
TABELA 11 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIA CONTRA <i>F. graminearum</i>	37
TABELA 12 – REDIMENTO DOS EXTRATOS DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS COM AS DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA IGUALAR A CONCENTRAÇÃO.....	41
TABELA 13 – MÉDIA DOS RESULTADOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>F.</i> <i>graminearum</i> PELOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS APÓS LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO	42
Tabela 14 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>F.</i> <i>graminearum</i> PELOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS APÓS LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC – Ágar Amido Caseína

AcOEt - acetato de etila

ARNr – Ácido ribonucleico ribossômico

BDA – Batata Dextrose Ágar

CEFG - Complexo de Espécie *Fusarium graminearum*

C° - graus Celsius

cm³ - centímetros cúbicos

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DON – desoxinivalenol

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g – gramas

GY – Glucose Yeast

H – horas

ha - hectare

kg - quilograma

L - litro

LabMicro - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitro

mm – milímetros

NIV – nivalenol

PI% - porcentagem de inibição;

Ppb – partes por bilhão

rpm – Rotações por minuto

SNA – Sacarose Nutriente Ágar

t/ha – Tonelada por hectare

YM – Yeast Malt

ZEA – zearalenona

µg – micrograma

µl – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA	19
2.2	METABÓLITOS E CONTROLE BIOLÓGICO	21
2.3	TRIGO	22
2.3.1	História	22
2.3.2	Produção	22
2.3.3	Cultivo	23
2.4	<i>Fusarium graminearum</i>	24
2.4.1	Micotoxinas	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.2	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS	28
3.3	COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS	30
3.4	TESTE DE INIBIÇÃO <i>in vitro</i> DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>F. graminearum</i>	31
3.5	OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO LÍQUIDO, DE ACTINOBACTÉRIAS	32
3.6	AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO DE ACTINOBACTÉRIA NO CONTROLE DE <i>F. graminearum</i>	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS	34
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS	36

4.2.1	TESTE DE INIBIÇÃO <i>in vitro</i> DO CRESCIMENTO MICELIAR DE <i>F. graminearum</i>	36
4.2.2	Obtenção e avaliação de eficiência do extrato bruto de actinobactéria no controle de <i>F. graminearum</i>	41
5	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS:	47

INTRODUÇÃO

O trigo no Brasil vem recebendo atenção crescente nos últimos anos com um número superior de pesquisas desenvolvidas e projetos em conjunto com instituições internacionais, para assim melhorar a qualidade das safras. Um grão é considerado de qualidade quando atende a requisitos físicos e químicos à produção de acordo com a expectativa dos consumidores, com máximo de rendimento, menor custo, e livre de contaminantes (MORI et al., 2016).

O fungo *Fusarium graminearum* é o principal causador da doença fusariose, também conhecida por giberela, nas regiões quentes do mundo, atacando vários cereais, principalmente o trigo. A infecção na planta geralmente ocorre na estrutura da antese, em épocas de maior umidade e temperatura. (PARRY; JENKINSON; McLEOD, 1995; LIMA, 2017; TRALAMAZZA et al., 2016a). Plantas infectadas com *F. graminearum* apresentam menor vigor, podem desenvolver podridão radicular e seus grãos se tornarem ardidos e não comercializáveis (MORI et al., 2016; PARRY; JENKINSON; McLEOD, 1995). Para prevenir o aparecimento da doença, o manejo integrado, rotação de culturas, uso de fungicidas e antagonistas biológicos devem ser empregados. Além de ser uma doença difícil de diagnosticar, pois os sintomas podem não estar aparentes, muitas linhagens de *Fusarium* são capazes de produzir micotoxinas (PARRY; JENKINSON; McLEOD, 1995; LIMA, 2017).

As micotoxinas são compostos químicos produzidos por fungos. Estes compostos provêm do metabolismo secundário e quando ingeridos causam danos à saúde humana e animal. Ao ingerir alimentos contaminados por micotoxinas, os sintomas são variados, como vômitos, náuseas, comprometimento da imunidade, neoplasias, dependendo a dose, espécie afetada e tipo de micotoxina sua ingestão pode levar um indivíduo a óbito. No trigo a micotoxina mais encontrada é o desoxinivalenol (DON) (DEL PONTE; GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2012; GUARIENTI et al., 2018; ROTTER; PRELUSKY; PESTKA, 1996).

Se comparado ao trigo importado a qualidade tecnológica do trigo nacional é inferior. A giberela afeta a qualidade do grão em geral, devido ao desenvolvimento das micotoxinas e produção de grãos enrugados e chochos (LIMA, 2017). Em 2011 foi estabelecido na legislação brasileira limites máximos de micotoxinas em grãos, por exemplo, para a micotoxina mais predominante no trigo, denominada desoxinivalenol,

a ANVISA, 2017a, determinou a quantidade máxima permitida de 1000 µg/kg, assim têm-se preocupado cada vez mais com a qualidade tecnológica e sanitária dos grãos (GUARIENTI et al., 2018).

A presença de patógenos em plantações de importância econômica é persistente. Para controlar a contaminação por fungos geralmente são feitas aplicações preventivas com fungicidas nas lavouras e manejo controlado (KIM; LEE; YUN, 2015; CONAB, 2017). Porém, o contínuo uso de químicos para doenças de plantas tem causado perdas grandes para o ecossistema e leva ao desenvolvimento de resistência dos patógenos, por isso, há uma demanda mundial em se reduzir o uso de químicos, como também achar alternativas para driblar a resistência que os patógenos vêm apresentando a estes (KIM; LEE; YUN, 2015; SHARMA; SALWAN, 2018).

Assim empresas e instituições de ensino têm procurado por soluções melhores, como microrganismos não patogênicos que ocorrem naturalmente no ambiente, e podem ser utilizados como agentes de biocontrole e fontes de novas substâncias menos agressivas (SHARMA; SALWAN, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As actinobactérias são caracterizadas por serem gram-positivas e possuem alto teor genético de guanina e citosina. Geralmente são saprófitas, podendo habitar a rizosfera de plantas saudáveis, como o trigo. As actinobactérias podem competir pelo nicho e espaço de um patógeno e, além disso, produzir metabólitos inibitórios. Vários estudos já demonstraram o potencial de actinobactérias em controlar microrganismos (COOMBS; FRANCO, 2003). Com a biotecnologia é possível produzir em grande quantidade compostos químicos, encontrados em bactérias, que oferecem proteção contra agentes nocivos e indesejáveis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A rizosfera é a parte do solo perto das raízes das plantas, onde geralmente há riqueza de nutrientes devido a influência das raízes, devido a acumulação de várias substâncias liberadas pela exsudação, secreção e deposição das raízes das plantas. A consequência disso é o enriquecimento da microbiota do solo, as actinobactérias da rizosfera são o filo mais dominante, tem uma importância econômica grande para os humanos, devido a sua contribuição para o sistema do solo, promoção do crescimento das plantas, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, potássio e zinco, ou produzindo antibióticos, enzimas e sideróforos. As actinobactérias são

enormemente influenciadas pelas circunstâncias do habitat, e os solos tem uma variedade de características que influenciam na diversidade e distribuição das actinobactérias, como o pH, a composição, a quantidade de chuvas, a salinidade, a temperatura, sendo assim ótimas para achar diversidade de substância úteis tanto para a agricultura, quanto para a saúde animal e humana (YADAV et al., 2018).

Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar actinobactérias do solo de plantação de trigo e avaliar sua capacidade, e de seu extrato, de inibir o crescimento do principal causador da giberela no trigo, *F. graminearum*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de inibição de actinobactérias isoladas do solo de cultivo de trigo contra *F. graminearum*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar actinobactérias provenientes de solo da região da rizosfera de cultivo de trigo;
- Avaliar o potencial dos isolados em inibir o crescimento do fungo *F. graminearum in vitro*;
- Selecionar actinobactérias eficientes na inibição do fungo *F. graminearum*;
- Produzir e avaliar os extratos de metabólitos de actinobactérias com potencial de controle do fungo *F. graminearum*.

2 REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

2.1 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias fazem parte das bactérias gram-positivas (filo *Actinobacteria*) que se diferenciam por apresentar alto conteúdo de guanina e citosina em seu genoma, podendo chegar a mais de 70% de sua composição (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016). A maior parte das espécies pertencem a ordem *Actinomycetales*. Os gêneros representativos de *Actinobacteria* de acordo com sequências do gene 16S do ARNr são *Micrococcus*, *Anthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* e *Streptomyces* dentro da ordem *Actinomycetales*, *Bifidobacterium* dentro da ordem *Bifidobacteriales* e *Coriobacterium* da ordem *Coriobacteriales* (MADIGAN et al., 2016).

As actinobactérias podem ser bacilares (*Mycobacterium*) ou filamentosas (*Streptomyces*, *Actinomyces*, *Nocardia*), podendo possuir filamentos que formam um micélio verdadeiro ou não. A maioria produz esporos, sendo empregados na classificação de subgrupos (MADIGAN et al., 2016). Muitas bactérias neste filo crescem somente como filamentos, similar ao micélio formado por fungos. São habitantes comuns do solo onde o modo de crescimento filamentoso apresenta vantagens, devido a maior capacidade de forrageamento, maior relação superfície/volume, maior absorção de nutrientes e dispersão de esporos facilitada. O gênero *Streptomyces* é a actinobactéria predominantemente isolada do solo, é um dos gêneros bem estudados com 500 espécies descritas. Elas preferem solos bem drenados, de alcalinos a neutros onde a oxigenação seja boa. (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; NOVAIS et al, 2017).

As actinobactérias possuem uma variedade de habitats. Em plantas do cerrado a actinobactéria *Frankia* é encontrada como um organismo fixador de nitrogênio, vivendo em simbiose com plantas não leguminosas. Também são encontrados representantes de actinobactérias em bactérias oxidantes de ferro, sendo aeróbias acidófilas. As actinobactérias propiônicas fermentam lactato a propionato, participando da maturação do queijo suíço. A maior parte das actinobactérias são aeróbias, comensais inofensivos, porém algumas espécies podem ser patogênicas ao

ser humano, como *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose. São encontradas também em regiões entre-marés de ambientes marinhos, participando da ciclagem de nutrientes. Também há uma grande diversidade de Actinobacteria marinhas em fontes hidrotermais devido a temperaturas que variam de 0 a 100 graus Celsius (°C) e elevada acidez (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016). Além disso, fazem parte dos principais filos habitantes da boca, do intestino e da pele humana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; MADIGAN et al., 2016; PORSANI, 2011).

Actinobacteria se reproduzem por fissão binária ou produzindo esporos ou conídios (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016). As actinobactérias filamentosas formam uma rede de filamentos, e se reproduzem por hifas aéreas, que se diferenciam em esporos resistentes a dessecação, sendo um importante meio para sua sobrevivência principalmente em épocas de estiagem. No caso de algumas actinobactérias como *Nocardia*, ocorre fragmentação das hifas em células cocóides e baciliformes para a reprodução (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; MADIGAN et al., 2016; PORSANI, 2011).

A aparência morfológica das actinobactérias é compacta, geralmente rugosa, e frequentemente em meio de cultura formam micélio aéreo. O micélio apresenta diferenciação suficiente para separar em grupos com características morfológicas, como a estrutura (algodonosa, aveludada ou pulverulenta), pigmentação, formação de zonas concêntricas, tamanho, forma e espessura (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

O micélio de substrato, conhecido como micélio vegetativo cresce no meio de cultura e na superfície, no microscópio os micélios são finos, transparentes, e mais ramificados do que as hifas aéreas. Em alguns grupos como *Nocardia* as hifas se fragmentam em partes cocóides ou em bastonetes. O micélio aéreo são hifas que se desenvolvem a partir de determinado estágio, onde as hifas vegetativas se diferenciam e ficam acima do substrato, estas são mais grossas e refrativas quando vistas em microscópio. A diferenciação da hifa aérea pode levar a formação de cadeia de esporos que podem ser divididos morfológicamente e são importantes para classificação das actinobactérias (LI et al., 2016).

As actinobactérias que produzem substâncias antibióticas podem ser observadas em placas de meios sólidos empregadas no isolamento, onde colônias

próximas de outras bactérias exibam zonas de inibição (MADIGAN et al., 2016). Assim pode-se isolar bactérias de interesse na produção de antibióticos.

2.2 METABÓLITOS E CONTROLE BIOLÓGICO

As actinobactérias produzem uma variedade de metabólitos primários, secundários e enzimas (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016). Muitos foram estudados e levaram a produção de importantes antibióticos comerciais, como a estreptomicina e tetraciclina (*Streptomyces*). (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Alguns actinomicetos produzem mais de um antibiótico, sendo geralmente moléculas de categorias diferentes. E embora o organismo seja resistente a seu próprio antibiótico ele permanece sensível a outros. Mais de 60 antibióticos provenientes de estreptomicetos são usados na medicina humana e veterinária. *S. noursei* e *S. nodosus* produzem polienos, nistatina e anfotericina B, que age contra fungos, em especial contra *Candida*. Um produto citotóxico que inibe o crescimento de linhagens de células, como células de adenocarcinoma gástrico foi isolado de *Nocardia* de solo de mangue (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016; MADIGAN et al., 2016).

Os metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento bacteriano em condições de laboratório, ainda assim, muitas substâncias foram geradas devido a mutações ao longo do tempo, revelando que essas substâncias de alguma forma podem ser importantes para o organismo (GRASSO; MARTINO; ALDUINA, 2016). Uma hipótese sugere que a produção destas substâncias está relacionada à esporulação, visando inibir o crescimento de outros microrganismos que competiriam com os actinomicetos por nutrientes limitados (MADIGAN et al., 2016).

Os metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias podem ser usados como base para formular novos compostos no combate a patógenos resistentes, como também podem ser utilizados como um agente no biocontrole. A colonização e biossíntese de antibióticos e outros metabólitos secundários podem prevenir o aparecimento e estabelecimento de patógenos invasores. Em plantas, compostos como herbimicinas já são utilizados para controlar o crescimento de ervas daninhas em monocotiledôneas e dicotiledôneas (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

As actinobactérias do solo têm interessantes potenciais antibióticos. Aproximadamente 60% dos herbicidas e inseticidas relatados nos últimos cinco anos vieram de *Streptomyces*. Kasugamicina descoberto de *Streptomyces kasugaensis* é um bactericida e fungicida utilizado no controle de *Pyricularia oryzae* e *Pseudomonas* em várias culturas de arroz. As polioxinas que inibem a produção de sintetase de quitina na parede celular de fungos, faz dela um antifúngico aceitável em relação ao impacto ambiental (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

Além do controle de pragas, actinobactérias também são importantes fatores de crescimento em plantas. A promoção do crescimento ocorre quando a planta recebe suplemento de um composto sintetizado pela bactéria ou a mesma facilita a absorção de nutrientes pela planta. (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

2.3 TRIGO

2.3.1 História

O trigo faz parte da família Poaceae, gênero *Triticum* e com várias espécies sendo a principal *Triticum aestivum* L. Originário do sudoeste da Ásia, é uma cultura de primavera ou inverno que está ligado a passagem da vida nômade dos seres humanos, para o estabelecimento de povoados. No Brasil o trigo surgiu com a colonização no século 16 (MORI et al., 2016).

O trigo está entre uma das principais alimentações da população mundial (BARANZELLI, 2018). Ele também é importante na composição de sistemas agrícolas sustentáveis pela rotação de sistemas (MORI et al., 2016).

Ao longo dos anos várias tecnologias voltadas a cultura do trigo estão permitindo a consolidação no país. Várias instituições vêm investindo na área como a Embrapa Trigo (MORI et al., 2016).

2.3.2 Produção

O incentivo e técnicas na plantação de trigo vêm aumentando significativamente no Brasil, embora ainda não existam métodos totalmente efetivos

para evitar doenças como a giberela (EMBRAPA TRIGO, 2017; PIRES, 2017). Em 2015, o Brasil havia produzido pouco mais que a metade do consumo nacional de trigo, 11 milhões de toneladas, e ainda apenas 30% servia para panificação, devido à baixa qualidade das safras (CONAB, 2015; CANAL RURAL, 2015). Embora em 2016 a safra tenha sido a recorde, com 6,726 milhões de toneladas, o Brasil ainda teve que importar mais 6,866 milhões de toneladas (CONAB, 2016; CANAL RURAL, 2016). No ano de 2018 a produção ainda se encontra menor que a importação. Já foram produzidas 4,657 milhões de toneladas, e 6,5 milhões foram importadas, porém tem-se procurado investir em áreas com plantação de trigo, devido à sua importância econômica (CONAB, 2018b).

O Estado do Rio Grande do Sul e Paraná são os maiores produtores de trigo, a região sul é responsável por quase 90% da produção. Para o ano de 2017, devido ao preço baixo de venda e ao excesso de precipitação na Região Sul em maio e na primeira quinzena de junho, a produção de trigo reduziu. As áreas semeadas mais cedo foram as que mais sofreram com incidência de doenças. Existem relatos de mancha foliar, giberela, brusone e oídio, as quais foram controladas com uso de fungicidas. No Brasil a produção ainda enfrenta vários obstáculos, além do preço para aquisição do trigo, as lavouras suscetíveis às doenças e que demandam tratamentos fitossanitários acabam elevando o custo da produção (CONAB, 2017) .

2.3.3 Cultivo

O trigo é uma gramínea com o sistema radicular fasciculado. É uma espécie que faz autofecundação, sua inflorescência chama-se espiga, tem uma amplitude variada dependendo do grupo bioclimático, gira em torno de 100 a 160 dias da semeadura até a maturação no Brasil. Necessita de vernalização, mesmo que pouca nos cultivares de primavera (MORI et al., 2016).

As lavouras comerciais no Brasil, possuem rendimentos de aproximadamente 5 t/ha. No cerrado em culturas irrigadas pode-se chegar a 9t/ha, porém sem irrigações, o potencial cai para até 4t/ha (MORI et al., 2016).

O ciclo de desenvolvimento do trigo começa com a semeadura. Após a embebição da semente, aparecem os primórdios foliares que se diferenciam até o início da fase reprodutiva. Então são diferenciados os primórdios da espiguetas até o

aparecimento da espiguetta terminal, o enchimento dos grãos começa com a floração, quando ocorre fecundação, onde a planta amadurece e os grãos acumulam matéria seca (MORI et al., 2016).

Para avaliar a aptidão tecnológica do trigo são levadas em consideração as seguintes variáveis de interesse econômico: força de glúten (representada pelo trabalho ou a energia necessária para deformar a massa, indica a qualidade de panificação da farinha), extensibilidade, número de queda (intensidade de atividade da enzima alfa-amilase no grão), peso do hectolitro (massa de 100 litros de trigo expressa em quilograma), relação entre a tenacidade e a extensibilidade, teor de proteína, teor de glúten, parâmetros de coloração de farinhas e presença de micotoxinas (GUARIENTI et al., 2018; MORI et al., 2016).

O período crítico do cultivo, que refletirá na quantidade de flores férteis e qualidade/quantidade dos grãos, é de 20 dias pré-floração e de 10 dias pós-floração, onde o manejo é de extrema importância (MORI et al., 2016). Além disso é importante que na época de colheita e de armazenamento a umidade não ultrapasse os 13%. A limpeza também é um fator de importância na redução da presença de micotoxinas (TIBOLA; FERNANDES; GUARIENTI, 2015).

2.4 *Fusarium graminearum*

Os fungos são seres eucariotos e multicelulares, com exceção das leveduras, que são unicelulares, que adquirem alimentos por absorção sendo quimio-heterotróficos. Embora sua importância por ajudarem na ciclagem de nutrientes na natureza, algumas espécies de fungos comprometem plantas, causando prejuízos severos a indústria alimentar como *F. graminearum*. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

No trigo os representantes do Complexo de Espécie *F. graminearum* (CEFG) são os principais causadores da doença giberela que afeta as espigas, tornando-as murchas, ardidas e não comercializáveis. Para as fases sexuadas e assexuadas de um fungo podem existir nomes distintos. Na giberela, a forma assexuada do fungo é dominante, e é denominada *Fusarium graminearum* (Schwabe), a forma sexuada é chamada *Gibberella zeae* (Schwabe) (TRALAMAZZA, 2016a; LIMA, 2017; MORI et al., 2016).

Além da doença nas espigas, *F. graminearum* pode afetar a raiz do trigo, causando podridão radicular, onde as plantas morrem precocemente, devido a depleção de nutrientes (PARRY; JENKINSON; McLEOD, 1995; MORI et al., 2016).

A giberela está entre as doenças de difícil controle em trigo. Principalmente quando o estágio de espigamento ocorre no período de chuva, o que também atrapalha o controle químico. Devido a condição ambiental na região Sul do Brasil, com chuvas de mais de 48 horas e temperaturas de 20° a 25°, podem ocorrer epidemias severas (MORI et al., 2016). Não há cultivar totalmente resistente, e só o controle químico não é suficiente para eliminar a doença, sendo necessárias várias medidas em conjunto, como o uso de fungicidas antes do começo de chuvas, caso esteja próximo a época de espigamento, utilizar cultivares com ciclos diferentes e escolher um cultivar moderadamente resistente (MORI et al., 2016).

Além de causar prejuízos econômicos por reduzir o rendimento e a qualidade, os grãos podem estar contaminados por micotoxinas, comumente do grupo dos tricotecenos e zearalenona (MORI et al., 2016). A ingestão de tricotecenos pode causar inibição da síntese proteica, cefaleias, náuseas graves, vômitos, e pode levar a óbito. São mais de 200 toxinas presentes nesta classe sendo DON e seus derivados as micotoxinas alimentares mais prevalentes do grupo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VEGA-HERRERA, 2017).

2.4.1 Micotoxinas

Diversas espécies de fungos são capazes de produzir metabólitos secundários denominados micotoxinas, compostos tóxicos que quando ingeridos com os alimentos são prejudiciais à saúde humana e de outros animais (CAST, 2003). O gênero *Fusarium* (Link, 1809) agrega inúmeras espécies fitopatógenas e produtoras de micotoxinas, fazendo dele um dos gêneros fúngicos mais estudados atualmente. As principais micotoxinas produzidas por *Fusarium* são desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) e nivalenol (NIV). No Brasil a Resolução nº 7 de 2011 estabelece limites da presença de micotoxinas em cereais destinados a alimentação humana. Para detectar a presença e quantidade de micotoxinas em grãos são utilizadas as técnicas de cromatografia e imunoenzimáticas (MORI et al., 2016).

Os tricotecenos fazem parte das micotoxinas produzidas pelos fungos, elas são o grupo mais conhecido, com vários compostos relatados como tóxicos. Elas são produzidas por várias espécies de *Fusarium*. A toxina DON faz parte deste grupo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; APS, 2018). No mundo uma das espécies e toxinas mais dominante são o *F. graminearum* e DON, respectivamente (SCHÖNEBERG et al., 2018). No Brasil na safra de 2015 a 2016, Guarienti et al. (2018, p. 84) mencionam que a micotoxina DON foi encontrada em 55% das amostras em seu estudo e 58% na safra de 2016 a 2017, os níveis variaram de 200 a 2743 ppb (partes por bilhão), já a micotoxina ZEA foi encontrada em 39% e 14% das amostras, exceto no estado de São Paulo para o ano de 2015/2016 e Paraná e Santa Catarina para o ano de 2016/2017. A legislação estabelece um limite de 1750 ppb para a toxina DON e 200 ppb para ZEA, sendo assim algumas amostras ultrapassaram os limites toleráveis.

No estudo de Tralamazza et al. (2016a), foi encontrada a toxina DON em todas as amostras analisadas com produção mediana de 453, 426 e 1200 µg/kg em SP, PR e RS, respectivamente e para a toxina ZEA, houve contaminação 12%, 84% dos grãos dos Estados do SP e RS respectivamente.

Estudos nos Estados Unidos e Europa mostraram que 50% dos cereais e produtos derivados eram positivos para presença de DON, e alguns destes possuíam altas concentrações. Um grande desafio de combate as micotoxinas é a sua termoresistência, continuando estáveis mesmo após o processamento dos alimentos (VEGA-HERRERA, 2017). As micotoxinas podem inviabilizar totalmente o consumo ou ocasionam uma redução do valor comercial (MORI et al., 2016).

Os tricotecenos podem ser divididos em quatro grupos (A-D) *F. graminearum* é uma das principais fontes de tricotecenos B em grãos, produzindo dos genótipos específicos: 3-ADON (DON e 3-acetildesoxinivalenol), 15-ADON (DON e 15-acetildesoxinivalenol) ou NIV (nivalenol e derivados). Hoje já existem abordagens de PCR desenvolvidas para rápida determinação desses genótipos (KULIK, 2011; WARD et al., 2002).

No estudo de Tralamazza, Braghini e Corrêa (2016b), foi constatado que o perfil 15-ADON é o mais relevante nos grãos de trigo nacionais, estando em 100% das amostras, com 96% de representação no DNA, seguido de 3,84% do NIV e apenas 0,06% de 3-ADON.

Em estudos atuais na América do Norte no isolamento de *F. graminearum* de trigo, onde os mesmos não produziam tricotecenos do tipo B, foram descobertas novas micotoxinas nomeadas NX-2 e NX-3 do grupo tricotecenos do tipo A. (VARGA et al., 2015). Um estudo recente (KELLY E WARD et al., 2018) demonstrou que *F. graminearum* NX2 divergiu de um ancestral em comum com a população 15-ADON e se estabeleceu no centro dos Estados Unidos, demonstrando a alta capacidade de adaptação dessa espécie.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório do departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná no período de agosto de 2017 a junho de 2018.

Foi feito isolamento de actinobactérias da rizosfera do plantio de trigo, e as mesmas foram testadas para avaliar a inibição em relação ao crescimento micelial de *F. graminearum*. Foram feitos extratos para avaliar se as substâncias produzidas inibiam o crescimento deste fungo.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os isolados de *F. graminearum* com diferentes perfis toxigênicos (Tabela 1) foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Fungos Micotoxigênicos e Micotoxinas da Universidade de São Paulo.

Os isolados de actinobactérias foram obtidos através de isolamento da rizosfera de área de plantio de trigo na região de Cascavel, Paraná sob as coordenadas 24°53'35" SUL e 53°29'41" OESTE, durante o mês de setembro de 2017.

TABELA 1 – ISOLADOS DE *Fusarium* UTILIZADOS no estudo

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	PERFIL TOXIGÊNICO	Origem	REFERÊNCIA
31FP	<i>Fusarium graminearum sensu stricto</i>	DON + 15-ADON	Trigo/ Brasil	Tralamazza et al., 2016a
29287	<i>Fusarium graminearum</i> s.s	DON + 3-ADON	Trigo/ USA	ARS Culture Collection, 2018b
66048	<i>Fusarium graminearum</i> s.s	NX2	Trigo/ USA	ARS Culture Collection, 2018a

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Os meios de cultura utilizados e sua composição estão descritos nas tabelas de 2 a 9.

TABELA 2 – MEIO DE CULTURA ÁGAR-AMIDO-CASEÍNA (AAC)

(continua)

Substância	Quantidade
Água destilada	1000 ml
Amido	10,0 g
Caseína	0,3 g

(conclusão)

Nitrato de Potássio	2,0 g
Cloreto de Sódio	2,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico	2,0 g
Sulfato de Magnésio	0,05 g
Sulfato Ferroso	0,01 g
Ágar	18,0 g

TABELA 3 – MEIO DE CULTURA WATER YEAST EXTRACT (WYE)

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Extrato de Levedura	0,25g
Ágar	18g
Fosfato de Potássio Dibásico	0,5g

TABELA 4 – MEIO DE CULTURA GLUCOSE YEAST (GY)

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Extrato de Levedura	10g
Ágar	16g
Glicose	10g

TABELA 5 – MEIO DE CULTURA CZAPEK DOX

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Ágar	15g
Nitrato de Sódio	2g
Sulfato de Magnésio	0,5g
Cloreto de Potássio	0,5g
Sulfato Ferroso	0,01g
Fosfato de Potássio Dibásico	1g
Sacarose	30g

TABELA 6 – MEIO DE CULTURA YEAST MALT (YM)

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Extrato de Levedura	4g
Ágar	20g
Dextrose	4g
Malte	10g

TABELA 7– MEIO DE CULTURA BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA) DA KASVI®

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Extrato de Batata	4g
Ágar	15g
Dextrose	20g

TABELA 8 – MEIO DE CULTURA SYNTHETIC NUTRIENT AGAR (SNA)

Substância	Fórmula
Água Destilada	1000 ml
Sacarose	50g
Ágar	28g

TABELA 9 – ÁGUA PEPTONADA 0,1%

Substância	Quantidade
Água Destilada	1000 ml
Peptona Bacteriológica	1g

TABELA 10 – CALDO YM

Substância	Fórmula
Água Destilada	1000 ml
Gelatina Digerida Enzimaticamente	5g
Extrato de Malte	3g
Dextrose	10g
Extrato de Levedura	3g

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°, 1 atm., por 20 minutos.

3.3 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

Como metodologia descrita por Porsani (2011) e adaptada para esta pesquisa, foram coletadas aleatoriamente 20 amostras de diferentes regiões do solo, contendo 15 cm³ de solo cada da região da rizosfera, utiliza-se espátulas esterilizadas, e armazenou-se dentro de tubos Falcon em geladeira até sua utilização. As amostras foram identificadas de S1 a S20. Para o isolamento as amostras foram acondicionadas em Erlenmeyers de 250,0 mililitros (ml) previamente esterilizados, foram diluídos 10 gramas (g) de solo em 90,0 ml de água peptonada 0,1% estéril; os frascos foram agitados por 15 minutos a 110 rpm em shaker, a 29°C e o sedimento decantado durante 10 minutos. Foi retirado 1,0 ml do sobrenadante em tubo com 9,0 ml de água peptonada, foram feitas 5 diluições a partir do primeiro, denominadas 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵, e após agitação em vórtex foram distribuídos 100 microlitros de cada diluição de cada amostra, com auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio de cultura WYE e AAC, com duas duplicatas para cada e incubadas cada duplicata duas temperaturas, 28°C e 37°C, por até 7 dias. As colônias foram isoladas em meio GY e Czapeck Dox, deixadas a 37°C em estufa por até 7 dias.

Depois do isolamento as colônias foram repicadas em tubos de ensaio inclinados com meio GY e Czapeck Dox. A coleção está sendo mantida a 4°C e repicada em meio Czapeck Dox a cada três meses.

Para identificar as actinobactérias, foram observadas as características macromorfológicas, os quais foram divididos em grupos, e micromorfológicas, observadas em microscopia óptica com coloração de Gram (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016; ANVISA, 2017b; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Inicialmente, grãos de trigo também foram utilizados para o isolamento de actinobactérias. Um total de 20 amostras com aproximadamente 100 g foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos esterilizados. Os grãos foram desinfetados previamente em hipoclorito 1% durante 2 minutos e enxaguados 3 vezes em água destilada autoclavada para retirada de contaminantes externos. Nas placas com meio AAC foram adicionados antifúngicos: 3 ml de ciclohexamida 0,011 g/ml e 3ml de nistatina 2560 mg/ml. Foi escolhida uma das amostras de trigo aleatoriamente e esta foi inoculada em placas de Petri com WYE e AAC, grãos inteiros em determinadas placas e partidos em outras, com 10 grãos/pedaços cada, com duplicata para as temperaturas de 28° e 37°C.

3.4 TESTE DE INIBIÇÃO *in vitro* DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *F. graminearum*

Para o teste de inibição foi utilizado o método desenvolvido por Cafaro e Currie (2005). Foi utilizado o meio de cultura Yeast Malt (YM) em placas de Petri de 9 cm. Foram selecionadas 29 linhagens de actinobactérias isoladas do solo contra o isolado de *F. graminearum* 31FP. O teste foi realizado em triplicata. A actinobactéria foi inoculada no centro da placa de Petri e cultivada por 7 dias em estufa a 28°C, então o fungo foi inoculado perto da borda da placa em dois lados paralelos. Foram deixados em estufa a 28°C e monitorados a cada dois dias, durante 8 dias ou até o fungo atingir seu crescimento máximo em placas de controle. A inibição do fungo foi verificada através da comparação do diâmetro do crescimento da colônia do fungo com actinobactérias e o fungo controle.

A porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium* foi calculada utilizando-se a medida do diâmetro das colônias e foi utilizada a fórmula de EDGINTON et al. (1971) citado por SILVA (2016), p. 20:

$$(PI\%) = (Dc - Dt) / Dc$$

onde:

PI% = porcentagem de inibição;

Dc = diâmetro médio da colônia de controle de *F. graminearum*;

Dt = diâmetro médio da colônia de *F. graminearum* crescida na placa contendo actinobactéria.

3.5 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO LÍQUIDO, DE ACTINOBACTÉRIAS

Os 4 isolados que obtiveram maior inibição foram crescidos em placas de Petri com meio YM durante 7 dias a 28°C. Após esse período foram inseridos 4 plugs de 5 mm de diâmetro dos isolados em Erlenmeyers de 500 ml com 100 ml de caldo YM e deixados em incubadora shaker a 28 C°, 160 rpm por 7 dias. Após isso, todo o conteúdo dos Erlenmeyers foi passado para Erlenmeyers novos de 1L com 400 ml de caldo YM e deixados crescer por mais 7 dias em shaker a 28°C. O caldo dos isolados foi filtrado em papel filtro e misturado com 400ml de acetato de etila (AcOEt), foram deixados em agitador magnético durante uma hora e após separada a parte orgânica da parte com aquosa. o extrato separado no AcOEt foi purificado mais duas vezes em 100 ml de AcOEt. O extrato resultante foi evaporado e seu conteúdo seco quantificado para as análises de inibição.

3.6 AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO DE ACTINOBACTÉRIA NO CONTROLE DE *F. graminearum*

Para a avaliação de inibição dos extratos foi realizada a técnica de microdiluição, norma M38-A da CLSI (ANTIGO NCCLS) (2003), onde a turbidez do meio é avaliada através do uso de espectrofotômetro. Para a realização da técnica, foram inoculadas em placas de Petri com meio SNA três isolados da espécie *F. graminearum* (Tabela 1). Foram feitas 6 placas para cada fungo e deixados crescer a

28° C por 7 dias. Os esporos de cada linhagem de fungo foram diluídos em solução salina a 0,85% e a contagem de esporos foi feita em Câmara de Neubauer para se chegar na mesma concentração para as três linhagens (10^4 esporos/ml). Os extratos foram diluídos em água destilada autoclavada e com dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% para ficarem com a mesma concentração.

O teste foi feito em placa de microtitulação de fundo chato com 96 poços para depois ser lido em espectrofotômetro. Foram utilizados poços em triplicata para cada linhagem de fungo, o volume total para cada poço foi de 200 microlitros (μ L). Nos poços com as amostras foram adicionados 50 μ L do extrato, 50 μ L da solução de esporos de *F. graminearum*, e 100 μ L de meio RPMI PAA laboratories, para o controle negativo foi utilizado 50 μ L de solução com DMSO, 50 μ L de esporos fúngicos e 100 μ L de meio RPMI, para o controle positivo foi utilizado 50 μ L de solução com o antifúngico Cercobin, 50 μ L de solução com esporos fúngicos e 100 μ L de meio RPMI. Para o fungo a concentração utilizada foi de 5×10^4 esporos/ml. A concentração final do extrato ficou 5 mg/ml, a concentração da solução $1,25 \times 10^4$ esporos/ml e a concentração do antifúngico (Cercobin) foi de 0,25 mg/ml. As placas foram armazenadas em estufa por 48h a 28°C. Após a incubação foi utilizado o espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek) para leitura.

Para a média de cada linhagem de fungo a coluna respectiva ao controle negativo foi subtraída para retirar a interferência de coloração de cada extrato. O grau de inibição foi calculado como porcentagem em relação ao crescimento fúngico, e feita a seguinte equação para se calcular a inibição (fórmula análoga a fórmula de EDGINTON et al. (1971) citado por SILVA (2016), p. 20):

$$(PI\%) = 100 \times (Ac - Ae) / Ac, \text{ onde:}$$

PI% = porcentagem de inibição;

Ac = Absorbância média do isolado de *F. graminearum* crescido em poços controle;

Ae = Absorbância média do isolado de *F. graminearum* crescido em poços contendo extrato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

Os testes iniciais demonstraram que as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} realizadas do solo apresentaram condições melhores para contagem e isolamento das culturas. Também o meio de cultura WYE demonstrou melhor crescimento dos isolados de actinobactérias sem a presença de outros organismos como fungos filamentosos e leveduras. Neste estudo, assim como no isolamento de COOMBS e FRANCO (2003) o meio pobre em nutrientes (WYE) foi mais efetivo para o isolamento de actinobactérias. Como observado por COOMBS e FRANCO e no presente estudo, no meio rico em nutrientes (AAC) não era possível identificar as culturas de actinobactérias e isolá-las antes que fungos e outras bactérias de crescimento rápido crescessem sobre toda a placa.

A temperatura ótima para o isolamento foi de 37°C, embora também tenha se obtido um bom crescimento a 28°C. Foi observada alta variação no número de colônias isoladas por amostra, demonstrando a diversidade dos micro-organismos encontrado no solo e a importância de realizar o isolamento em um número grande amostras.

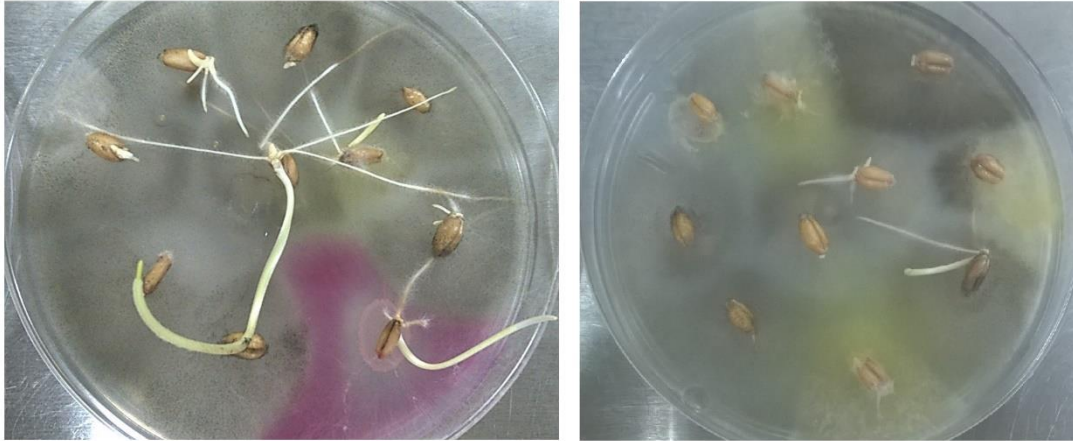
Não houve crescimento significativo de actinobactérias nas placas inoculadas com grãos de trigo. Mesmo em meio pobre, a maior parte do crescimento foi de fungos filamentosos (FIGURA 1). Sendo assim foi decidido continuar o isolamento e futuras análises somente com actinobactérias da rizosfera do trigo. Hallmann et al. (1997) descreve que nem sempre é possível isolar microrganismos através de meios de cultura, devido ao meio selecionar apenas organismos que conseguem utilizar seus nutrientes.

Das 255 culturas isoladas, 83 foram classificadas como actinobactérias pela macromorfologia (FIGURA 2) e pela micromorfologia (FIGURA 3) através da coloração de Gram. Na micromorfologia foi possível observar as pseudo-hifas Gram positivas características de *Streptomyces*, indicada pelas setas (FIGURA 3).

Zhao et al. (2012) isolou 20 gêneros de actinobactérias da rizosfera de plantas medicinais na China, sendo o gênero *Streptomyces* o mais frequente e com maior

atividade antibiótica. Nossa pesquisa corrobora com esse resultado, o gênero mais encontrado também foi *Streptomyces*.

FIGURA 1 – PLACAS DE PETRI COM MEIO WYE INOCULADAS COM GRÃOS DE TRIGO A 28°C (ESQUERDA) E 37°C (DIREITA) POR 5 DIAS



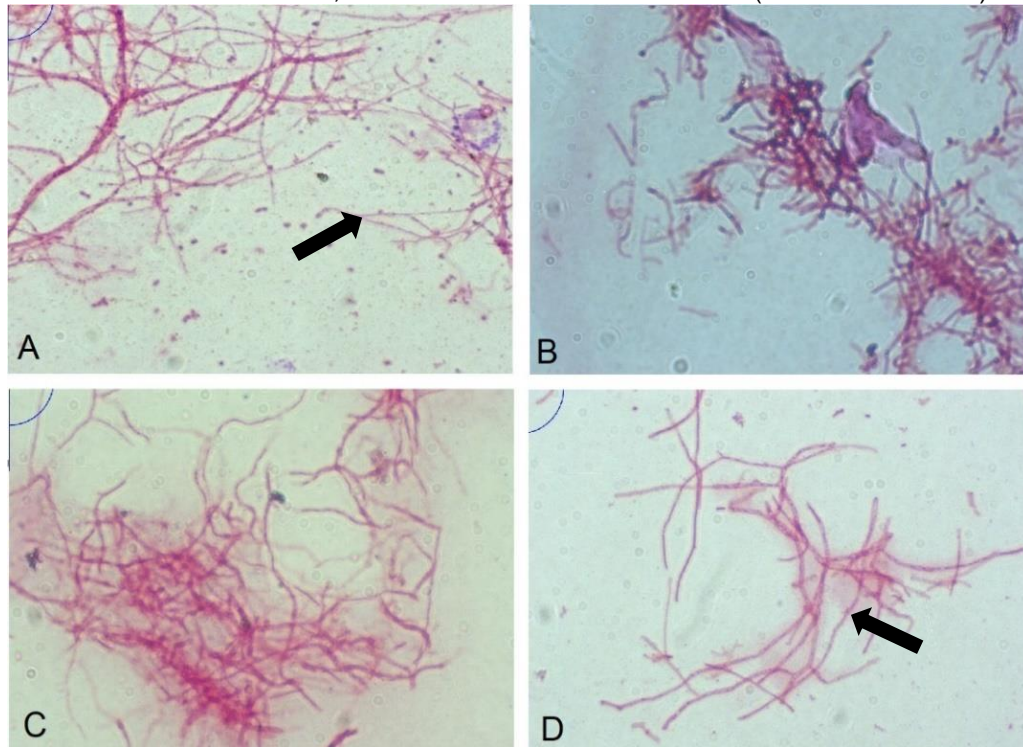
FONTE: O autor (2018)

FIGURA 2 – MACROMORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DE ACTINOBACTÉRIAS CRESCIDAS EM MEIO CZAPEK DOX, A 37°C, DURANTE ATÉ 14 DIAS



FONTE: O autor (2018)

FIGURA 3 – MICROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS A - GY04, B - CZ91, C - CZ122, D - CZ201 CORADAS EM GRAM (AUMENTO 1000X)



Legenda: As setas indicam as pseudo-hifas.

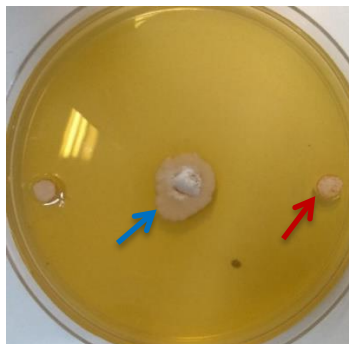
FONTE: O autor (2018)

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS

4.2.1 TESTE DE INIBIÇÃO *in vitro* DO CRESCIMENTO MICELIAR DE *F. graminearum*

Foram selecionadas a partir da morfologia 29 isolados de actinobactérias. Os isolados foram inoculados no centro de placas de Petri com YM, contra o fungo *F. graminearum*, inoculados na borda da placa em dois lados paralelos (FIGURA 4).

FIGURA 4 – MODELO DE TESTE DE INIBIÇÃO (MÉTODO ADAPTADO DE CAFARO E CURRIE, 2005)



FONTE: O autor (2018)

Legenda: A flecha azul indica o inóculo de actinobactéria e a flecha vermelha indica o inóculo de *F. graminearum*.

Esse teste auxiliou na seleção preliminar de actinobactérias que possuíam compostos antifúngicos, visto que não é garantido que os compostos ativos se difundam no ágar (PORSANI, 2011).

Das 29 actinobactérias testadas, todas apresentaram algum nível de inibição contra *F. graminearum*, as mesmas se encontram relacionadas na TABELA 11 juntamente ao cálculo de porcentagem de inibição. A quantidade inibida (+) foi baseada no tamanho da colônia do fungo após 8 dias de crescimento em presença da actinobactéria, comparado com o crescimento na ausência da actinobactéria. De maneira geral 8 dias foi o período no qual a cultura do fungo atingiu seu tamanho máximo. Quando a inibição foi mínima, onde a redução do tamanho da colônia do fungo foi causada pela disputa de espaço, foi considerado grau de inibição 0, porém foi informado na tabela a porcentagem de inibição. O isolado Cz91 se destacou por inibir 69% do crescimento de *F. graminearum*. Os isolados Gy04 e Cz201 também se destacaram por inibir aproximadamente 50% do crescimento fúngico (FIGURA 5).

TABELA 11 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIA CONTRA *F. graminearum*.

(continua)

Isolado	Grau de inibição	Porcentagem de inibição (%)
Cz91	+++++	69
Gy04	++++	56
Cz201	++++	47
Cz122	+++	38
Cz92	+++	38
Gy23	+++	38
Gy22	+++	36

(conclusão)

Gy51	+++	36
Cz08	++	33
Cz162	++	33
Cz56	++	29
Cz128	++	24
Gy17	++	24
Cz90	+	20
Cz130	+	20
Cz99	+	18
Cz191	+	18
Gy08	+	18
Cz142	+	16
Cz26	+	16
Cz138	+	13
Cz77	0	11
Cz150	0	11
Cz67	0	11
Gy27	0	11
Gy14	0	11
Cz131	0	9
Gy28	0	7
Cz115	0	4

FONTE: O autor (2018)

Legenda: Grau de inibição do crescimento fúngico de acordo com seu tamanho em relação ao controle: < 2,0 cm: +++++; > ou = a 2,0 cm: +++++; > ou = a 2,5 cm: ++++; > ou = a 3,0 cm: ++; > ou = a 3,5 cm: +; >4,0 cm de diâmetro: 0.

Carvalho e Sand (2016) relataram que o isolado cultivado em seu estudo, um actinomiceto endofítico de raízes de tomate, obteve bons resultados contra bactérias Gram-negativas multirresistentes a antibióticos. Essas bactérias possuem um papel importante na rizosfera, visto que protegem as raízes das plantas contra patógenos e fatores ambientais.

No estudo de PORSANI et al. (2011), actinobactérias da região entre marés da Ilha do Mel, PR, apresentaram grande atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus Aureus*, representante de bactérias de importância clínica gram-positivas e *Pseudomonas aureginosa* e *Escherichia coli*, das bactérias gram-negativas, e contra *Candida albicans*, uma levedura isolada frequentemente como patógeno oportunista, das 116 actinobactérias testadas, 79 apresentaram atividade antimicrobiana. Trabalhando com o isolamento e controle biológico em mudas de *Eucalyptus sp.* no estudo de SILVA (2014), as 5 actinobactérias isoladas que

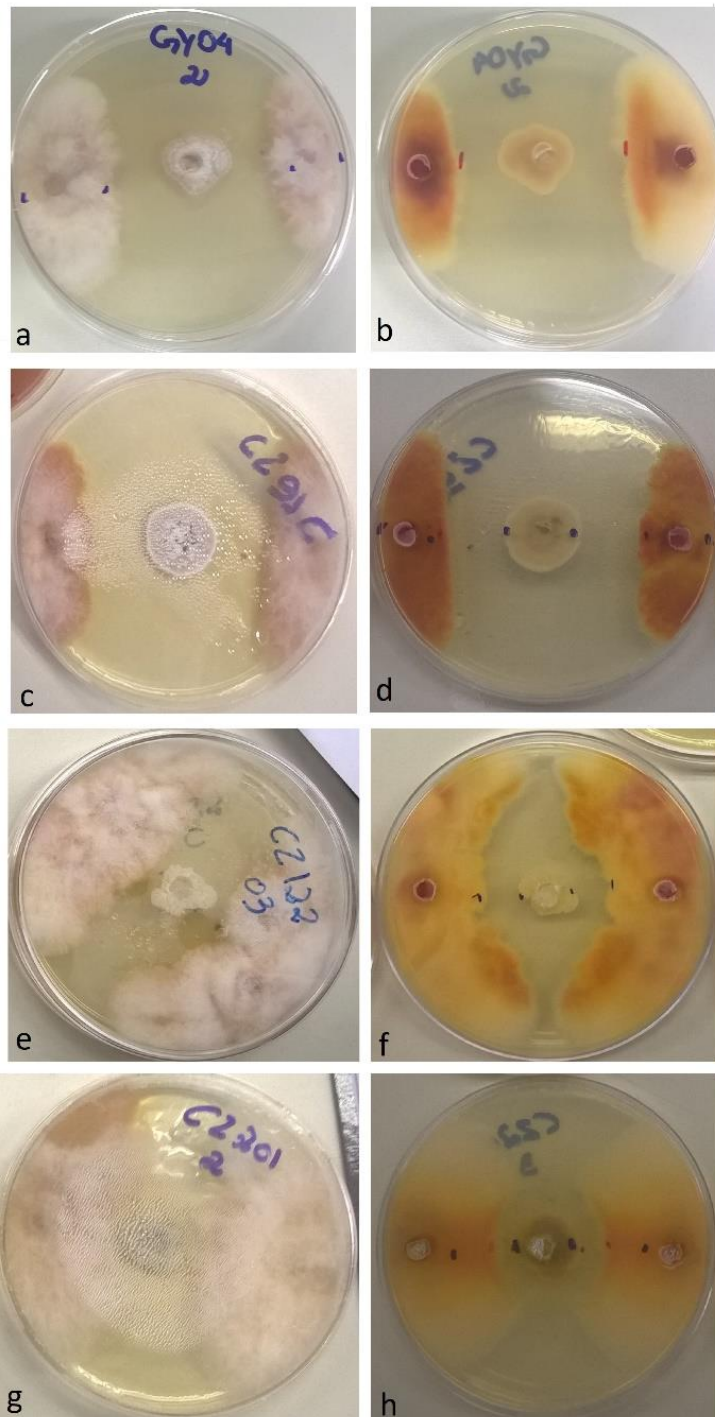
obtiveram melhor resultado no teste, previamente obtidas por Porsani et al. (2013), testadas contra o fungo patógeno *B. cinerea* apresentaram diminuição significativa a 1% de probabilidade, inibindo 81% do crescimento em 14 dias para a maior inibição e 58% para a menor inibição, do patógeno.

No estudo de SANTOS et al., 2016, os isolados de actinobactérias se mostraram eficientes no manejo de nematoides e na pesquisa de Robles-Hernandez, 2015, foi mostrado o potencial de inibição do fungo *Fusarium* pelo isolado de *Streptomyces PRIO41*, este isolado apresentou atividade antagônica nos 26 isolados de *Fusarium* testados, A média do da inibição em meio BDA foi de 57,6% e em meio Czapek-Dox foi de 37,6%. Como observado por Roble-Hernandez, em nosso estudo também ocorreu alterações morfológicas, diminuição da propagação do micélio e pigmentação distinta do fungo na presença da actinobactéria.

FILHO et al. (2009) isolou *Streptomyces setonii* de rizosfera de tomateiro, e obteve bons resultados em reduzir a severidade de sintomas de patógenos fúngicos e bacterianos, inclusive em campo, reduzindo pela metade a quantidade de lesões por folíolos, que foi incitada por quatro patógenos *Corynespora cassicola*, *Stemphylium solani*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

No estudo de ELBENDARY et al. (2018) foram isoladas actinobactérias de 100 amostras de solo agrícola do Egito, onde 12 isolados produziram atividade contra microrganismos testados, mostrando que as actinobactérias do solo possuem um bom espectro de inibição. No presente estudo foram coletadas 20 amostras de solo, e dos vinte e nove isolados testados para inibição, 8 tiveram um bom resultado, ficando com inibição acima de 35% e 21 apresentaram inibição.

FIGURA 5 –TESTE DE INIBIÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS CONTRA O ISOLADO DE *F. graminearum* PARA AS QUATRO MAIORES INIBIÇÕES EM MEIO DE CULTURA YM, APÓS 8 DIAS A 28°C



FONTE: O autor (2018)

Legenda: Coluna da esquerda: verso da placa. Coluna da direita: reverso da placa. Fotos **a** e **b** - Isolado Gy04; **c** e **d** - Isolado Cz91; **e** e **f** - Isolado Cz122; **g** e **h** - Isolado Cz201.

4.2.2 Obtenção e avaliação de eficiência do extrato bruto de actinobactéria no controle de *F. graminearum*

Os quatro isolados que apresentaram um maior grau de inibição foram utilizados para a obtenção do extrato. O rendimento dos extratos e sua diluição para igualar a concentração para uso no teste contra *F. graminearum* encontra-se na TABELA 12. O extrato que obteve maior rendimento foi o do isolado Cz122.

TABELA 12 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS COM AS DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA IGUALAR A CONCENTRAÇÃO.

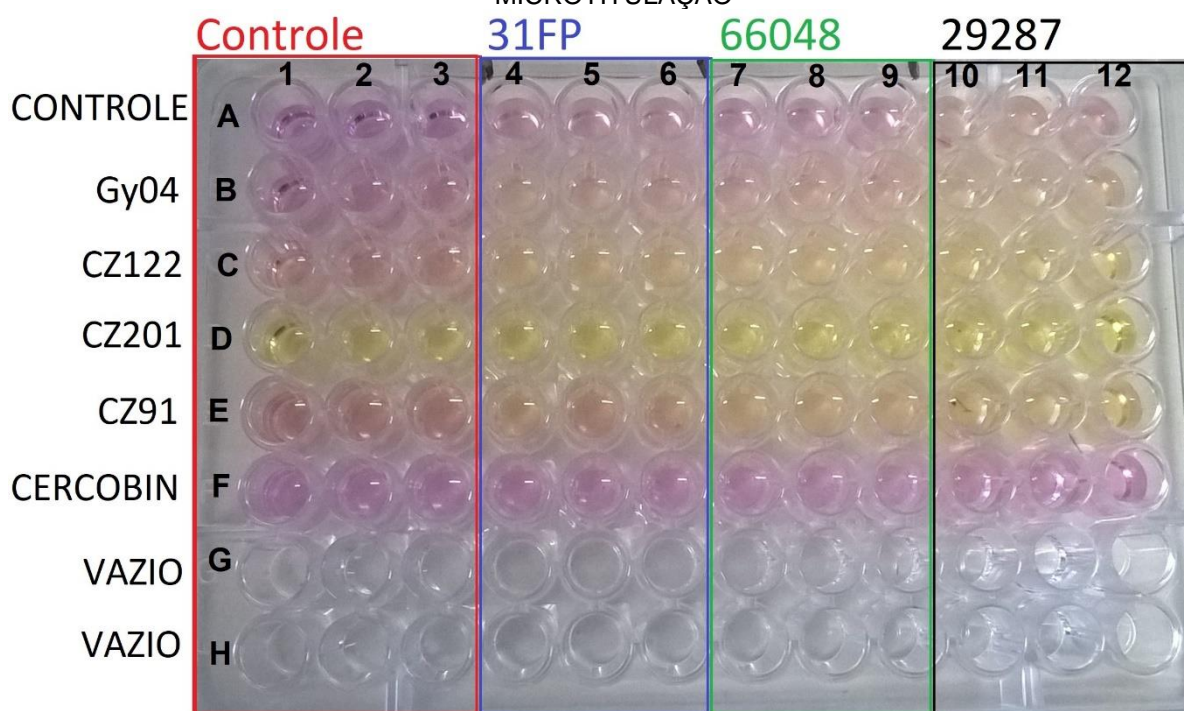
Isolado	Extrato	Rendimento	L22	H ₂ O
Gy04	EGy04	0,030 g	0,15ml	1,35ml
Cz122	ECz122	0,096 g	0,48ml	4,32ml
Cz91	ECz91	0,067 g	0,335ml	3,015ml
Cz201	ECz201	0,089 g	0,445ml	4,005ml

FONTE: O autor (2018)

Legenda: L22 – Dimetilsulfóxido (CH₃)₂SO com concentração de 10%. Concentração final dos extratos foi de 5mg/ml

Os poços das colunas 1, 2, 3 foram utilizados como controle negativo para crescimento fúngico, colocando-se apenas solução salina 0,85%; os poços das colunas 4, 5, 6 foram utilizados com a linhagem 31FP de *F. graminearum*; os poços das colunas 7, 8, 9 foram utilizados com a linhagem 66048; os poços das colunas 10, 11, 12 foram utilizados com a linhagem 29287; nos poços da linha A foi adicionado apenas solução de dimetilsulfóxido a 10% em água destilada autoclavada para controle negativo; nos poços da linha B, C, D e E foram aplicados os extratos Gy04, Cz122, Cz201 e Cz91 respectivamente; Nos poços da linha F foi aplicado o antifúngico Cercobin para controle positivo (FIGURA 6).

FIGURA 6 – TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *F. Graminearum*, 31FP, 66048 E 28287, PELO EXTRATO DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO



FONTE: O autor (2018)

Após o período de incubação as placas foram lidas em espectrofotômetro, a média dos resultados encontram-se na TABELA 13.

Para o antifúngico Cercobin, quando o resultado do espectro do isolado 31FP e 66048 foi subtraído do controle, o resultado ficou negativo em 0,012 e 0,002, respectivamente, porém foi arredondado para zero para fins de cálculo, visto que nos poços vazios a variação do espectro se encontrava entre 0,048 e 0,065, indicando que uma variação de até 0,017 é proveniente dos poços, não afetando os resultados.

TABELA 13 – MÉDIA DOS RESULTADOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *F. graminearum* PELOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS APÓS LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO

Extrato/Isolado	Controle	Isolado <i>F. graminearum</i>		
		31FP	66048	29287
Controle	0,061	0,272	0,290	0,549
GY04	0,081	0,257	0,214	0,367
CZ122	0,062	0,170	0,218	0,315
CZ201	0,064	0,110	0,073	0,117
CZ91	0,075	0,109	0,227	0,437
CERCIBIN	0,191	0,179	0,189	0,369
Poços vazios	0,056	0,050	0,053	0,053

FONTE: O autor (2018)

Tomando-se como base a absorbância das colônias de controle negativo para o fungo, e, subtraindo-se a absorbância de cada extrato, podemos inferir a quantidade de inibição de cada extrato pela absorbância do espectro. Quanto menor o valor, menor foi a absorbância. Ou seja, menor crescimento fúngico e maior inibição. Conforme tabela 14 onde os dados encontram-se transformados em porcentagem.

Tabela 14 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *F. graminearum* PELOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS APÓS LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO

Extrato/Isolado	Isolado <i>F. graminearum</i>		
	31FP	66048	29287
Controle	0%	0%	0%
GY04	17%	42%	41%
CZ122	49%	32%	48%
CZ201	78%	96%	89%
CZ91	84%	34%	26%
CERCOBIN	100%	100%	64%

FONTE: O autor (2018)

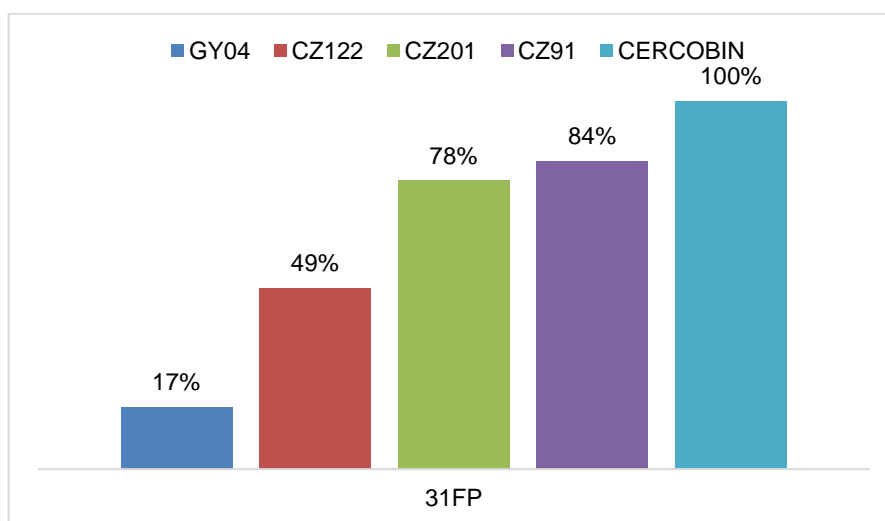
Todos os extratos apresentaram algum grau de inibição, corroborando com o resultado do teste de inibição utilizando as actinobactérias. Para a linhagem 31FP o antifúngico inibiu 100%, como esperado, o extrato ECz91 e ECz201 apresentaram maior inibição com, 84% e 78% de inibição, respectivamente (GRÁFICO 01). EGY04 teve uma ótima inibição no teste inicial, porém o mesmo não ocorreu quando da utilização do seu extrato, ficando com apenas 17% de inibição. No caso da linhagem 66048 somente o extrato de Cz201 obteve inibição de 96% como pode-se observar no GRÁFICO 02. Já no GRÁFICO 03 o extrato de Cz201 inibiu 89% do crescimento da linhagem 29287. Porém deve-se destacar que o antifúngico inibiu apenas 64% do crescimento, situação não esperada. Isso foi provavelmente ocasionado por um erro na preparação do ensaio, ou ainda por resistência do fungo ao antifúngico. Este teste deve ser repetido futuramente para confirmar os resultados.

A baixa inibição do extrato de Gy04 comparado aos testes iniciais com o organismo vivo, pode ser justificada pela não solubilização completa de seu composto em acetato de etila, como observado no estudo de BHUNU, MAUTSA e MUKANGANYAMA (2017), onde foram feitos extratos utilizando solventes diferentes e depois testados contra o crescimento de biofilme de *Mycobacterium aurum*, o qual o composto alvo não foi extraído completamente quando utilizado acetato de etila e devido a isso o extrato deste foi menos eficiente. Ou ainda conforme citado por

CARVALHO E SAND (2016) que a síntese de compostos ativos não é estável, e pode se alterar dependendo do meio de cultura utilizado, o qual se diferenciou devido a ser um caldo de fermentação, um pouco diferente do meio sólido utilizado no teste de inibição *in vitro*.

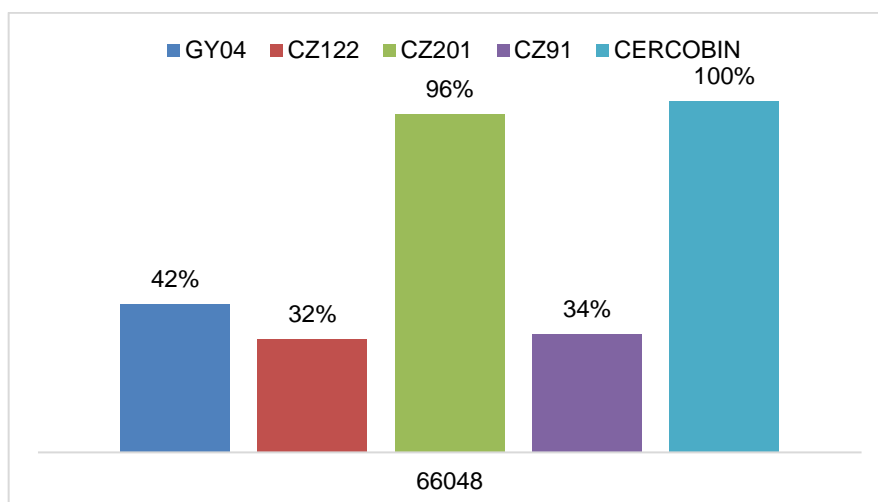
A inibição através de extratos pode ser observada em outras análises como a de LI (2018), que isolou 27 actinobactérias da rizosfera de juncos em Zhalong Wetland, na China, dos quais foram feitos extratos e 10 obtiveram amplo espectro de atividade antibiótica, a análise através de cromatografia indicou a presença de vários metabólitos secundários.

GRÁFICO 01 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE ACTINOBACTÉRIA CONTRA *F. graminearum* 31FP



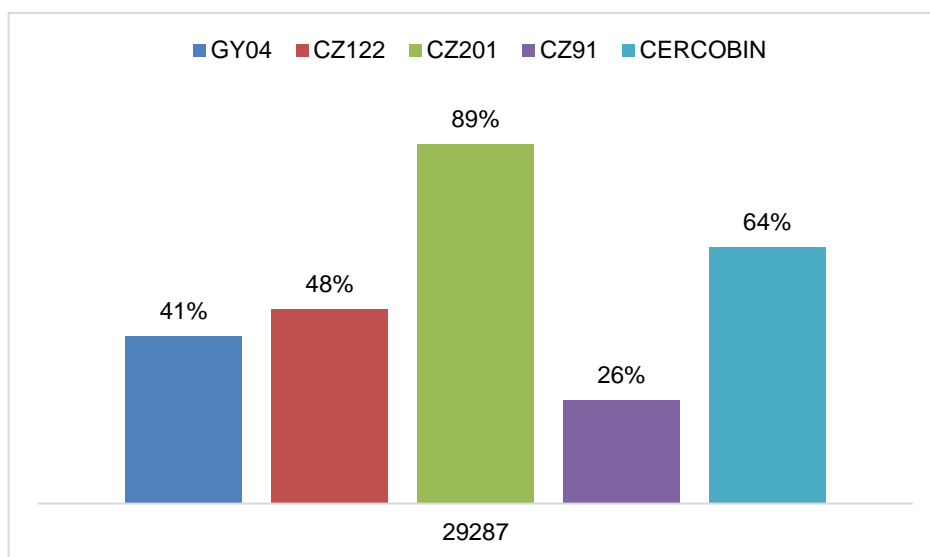
FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 02 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE ACTINOBACTÉRIA CONTRA *F. graminearum* 66048



FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 03 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE ACTINOBACTÉRIA CONTRA *F. graminearum* 29287



FONTE: O autor (2018)

Os resultados deste trabalho reforçaram que actinobactérias da rizosfera são bons candidatos para o controle biológico de fungos fitopatogênicos. Juntamente, os extratos brutos produzidos apresentaram alto potencial de inibição contra isolados de *F. graminearum* de diferentes origens e perfis micotoxigênicos. É importante destacar que até o presente momento, este é o primeiro trabalho que pesquisou actinobactérias para o controle do recém descoberto *F. graminearum* produtor da toxina tricotecenos tipo A - NX2 (isolado 66048). Futuramente, essas bactérias serão identificadas molecularmente e seus compostos ativos de interesse estudados em diferentes condições para a otimização do seu potencial inibitório.

Há uma alta demanda para a descoberta de compostos para o controle de micro-organismos patogênicos. Na atual e constante mudança climática os micro-organismos estão se adaptando mais rapidamente ao ambiente que seus hospedeiros o que leva o aparecimento de novos genótipos resistentes a fungicidas e antibióticos e capazes de driblar as defesas dos hospedeiros que infectam. Dessa forma, espera-se desenvolver compostos eficazes no controle de fitopatógenos.

5 CONCLUSÕES

- Foram isoladas 83 actinobactérias, as quais foram confirmadas através de micromorfologia com coloração de Gram.
- Das 29 actinobactérias testadas para inibição do fungo *F. graminearum*, oito apresentaram resultados promissores, inibindo acima de 38% o crescimento micelial de *Fusarium*.
- Os isolados que obtiveram as maiores inibições foram: Cz91, Gy04, Cz201 e Cz122, inibindo o crescimento micelial de *F. graminearum* em 69%, 56%, 47% e 38% respectivamente.
- Os extratos provenientes dos isolados de maior inibição foram efetivos em inibir isolados de *F. graminearum* com diferentes perfis toxigênicos.
- O extrato Cz201 foi o que inibiu em maior porcentagem os isolados fúngicos.
- Este estudo foi o primeiro a testar compostos para o controle de *F. graminearum* produtor de tricoteceno NX2.

REFERÊNCIAS:

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2017a. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0>. Acesso em: 03 jul. 2018
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2017b. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicos/audes/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em: 03 out. 2017.
- ANANDAN R.; DHARUMADURAI D.; MANOGARAN G. P. An Introduction to Actinobacteria. In: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**. IntechOpen, p. 3-37, 2016.
- APS (THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY). Micotoxinas nas Lavouras (Culturas, pt): Um Perigo à Saúde Humana e de Animais Domésticos. Disponível em:
<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Micotoxinas/Pages/TrichothecenesPort.aspx>> Acesso em: 05 jul. 2018.
- ARS CULTURE COLLECTION. 66048. 2018a. Disponível em:
<<https://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/mold/report.html?nrrlcodes=66048>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ARS CULTURE COLLECTION. 29287. 2018b. Disponível em:
<<https://nrrl.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/mold/report.html?nrrlcodes=29287>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- BARANZELLI, J.; KRINGEL, D. H.; COLUSSI, R.; PAIVA, F. F.; ARANHA, B. C.; MIRANDA, M. Z. DE.; ZAVAREZE, E. DA R.; DIAS, A. R. G. Changes in enzymatic activity, technological quality and gamma-aminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination. **LWT - Food Science and Technology**, Pelotas, RS, Brasil, v. 90, p. 483-490, 2018.
- BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.-P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH Y.; WEZEL G. P. VAN. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80 (1) p.1-43, 2016.
- BHUNU, B.; MAUTSA, R.; MUKANGANYAMA, S. Inhibition of biofilm formation in Mycobacterium smegmatis by Parinari curatellifolia leaf extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, p.285, 2017.
- CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Can. J. Microbiol.**, v. 51, p. 441-446, 2005.

CANAL RURAL. Brasil é capaz de produzir além de sua demanda doméstica de trigo. São Paulo, 10 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/trigo/brasil-capaz-produzir-alem-sua-demanda-domestica-trigo-65065>> Acesso em: 30 mai. 2018.

CANAL RURAL. Por que o Brasil importa tanto trigo? São Paulo. 5 out. 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/trigo/por-que-brasil-importa-tanto-trigo-59141>> Acesso em: 14 mai. 2018.

CARVALHO, T.; SAND, V. D. S. Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18(6) against multiresistant Gram-negative bacteria. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v.88 n.1, 2016.

CONN, V. M.; FRANCO, C. M. M. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. **Appl. Environ. Microbiol.**, Australia, v. 70(3) p. 1787-1794, 2004

COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. **Applied and Environmental Microbiology**. Australia, v. 69, n. 9, p. 5603-5608, 2003. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/69/9/5603.full#corresp-1>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2016. **Levantamentos de Safra** em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_boletim_graos_janeiro_2016.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2017.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2017. **Levantamentos de Safra** em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2017.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira grãos, Safra 2017/18 - Nono levantamento**. Brasília, v. 9, p. 1-178, 2018a. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Quadro de Oferta e Demanda, Trigo, 2001 a 2018**. 2018b. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/oferta/oferta-dashboard>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132(2) , p. 1087-1091, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611016177>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

DONN, S.; KIRKEGAARD, J. A.; PERERA, G.; RICHARDSON, A. E.; WATT, M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 17(3), p. 610-621, 2015.

ELBENDARY, A. A.; HESSAIN, A. M.; EL-HARIRI, M. D.; SEIDA, A. A.; MOUSSA, I. M.; MUBARAK, A. S.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; JAKEE, J. K. E. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples.

Saudi Journal of Biological Sciences, v. 25(1), p. 44-46, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

EMBRAPA TRIGO. Escape da giberela começa na implantação da lavoura. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/trigo/busca-de-noticias/-/noticia/24862309/escape-da-giberela-comeca-na-implantacao-da-lavoura>>. Acesso em: 18 mai. 2018.

FARIAS, A. R.; MINGOTI, R.; HOLLER, W. A.; SPADOTTO, C. A.; FILHO, E. L.; MORI, C. DE; CUNHA, G. R. DA; DOSSA, A. A.; FERNANDES, J. M. C.; SILVA, M. S. E. Potencial de produção de trigo no Brasil a partir de diferentes cenários de expansão da área de cultivo. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento online**. Passo Fundo, Embrapa Trigo & Campinas, Embrapa Gestão Territorial, 40 p. 2016.

FILHO, R. C.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L. S.; GARCIA, F. A. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Hortic. Bras.**, Brasília, v. 27(3), p. 340-344, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362009000300014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jun. 2018.

GRASSO, L. L.; MARTINO, D. C.; ALDUINA, R. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. In: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**. IntechOpen, 2016. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/production-of-antibacterial-compounds-from-actinomycetes>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

GUARIENTI, E. M.; MIRANDA, M. Z. de; CUNHA, G. R. da; NICOLAU, M.; TIBOLA, C. S.; FORCELLINI, S.; VIEIRA, D. C. da C.; LIMA, M. V. de. Qualidade tecnológica de trigo colhido e armazenado no Brasil – safras 2015/2016 e 2016/2017. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/178390/1/ID44342-2018DO178.pdf>>. Acesso em: 24 mai. 2018.

HALLMANN, J. QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** Canada, v.43, p. 895-914, 1997.

KELLY, A. C.; WARD, T. J. Population genomics of *Fusarium graminearum* reveals signatures of divergent evolution within a major cereal pathogen. **PloS one**, v. 13(3), p. 1-32, 2018.

KIM, Y. S.; LEE, K., YUN, B. S. Antagonistic Effect of *Streptomyces* sp. BS062 against *Botrytis* Diseases. **Mycobiology**. v. 43(3), p. 339-342, 2015.

KULIK, T. Development of TaqMan assays for 3ADON, 15ADON and NIV *Fusarium* genotypes based on Tri12 gene. **Cereal Research Communications**, v.39. p. 200-214, 2011.

LI, Y.; LI, Y.; LI, Q.; GAO, J.; WANG, J.; LUO, Y.; FAN, X.; GU, P. Biosynthetic and antimicrobial potential of actinobacteria isolated from bulrush rhizospheres habitat in Zhalong Wetland, China. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 695–705, 2018.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological Identification of Actinobacteria, In: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**, IntechOpen, 2016. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/morphological-identification-of-actinobacteria>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

LIMA, M. I. P. M. Identificação Prática de Giberela em Trigo. **Documentos online**. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2017. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/172470/1/ID44296-2017DO176.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

LIU, X.; CONG, J.; LU, H.; XUE, Y.; WANG, X.; LI, D.; ZHANG, Y. Community structure and elevational distribution pattern of soil Actinobacteria in alpine grasslands. **Acta Ecologica Sinica**, v. 37(4), 2017, p. 213-218. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.02.010>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK. **Microbiologia de Brock**. 12^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANUAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (Antigo NCCLS). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. **Norma Aprovada**, 6 Ed., v. 23(2), 2003.

MORI, C. de; ANTUNES, J. M.; FAÉ, G. S.; ACOSTA, A. da S. Trigo : o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Coleção 500 Perguntas, 500 respostas**; Brasília, DF, Embrapa, 2016

NOVAIS, C. B.; PEPE, A.; SIQUEIRA, J. O.; GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C. Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci. agric**. Piracicaba, v. 74(5), p. 411-416, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162017000500411&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 ago. 2017.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; McLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. **Plant Pathology**., Newport, Reino Unido, v. 44, p207-208,

1995. Disponível em: <<https://eurekamag.com/pdf/002/002848216.pdf>>. Acesso em: 11 mai.2017.

PIRES, J. L. F. EMBRAPA TRIGO. Artigo - A importância do trigo para a sustentabilidade da agricultura brasileira. 2017 em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/trigo/busca-de-noticias/-/noticia/23416523/artigo---a-importancia-do-trigo-para-a-sustentabilidade-da-agricultura-brasileira>> Acesso em: 10 mai. 2018.

PORSANI-AZUMA, M. V. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PORSANI, M. V. ; AMATUZZI, R. F. ; OLIVEIRA, B. H. ; BARATTO, L. C. ; DALITZ, C. A. ; BOZZA, A. ; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P. R. ; KOLM, H. E. ; PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical. Chemical and Biological Sciences**, v. 3, p. 899-913, 2013

ROBLES-HERNANDEZ, L.; HERNÁNDEZ-HUERTA, J.; GONZÁLEZ-FRANCO, A. C.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, O. A., NÚÑEZ-BARRIOS, A.; PÉREZ-LEAL, R. *Streptomyces* PRIO41 como promotor de crecimiento en plantas de chile jalapeño y agente de control biológico de *Fusarium*. **Phyton** (B. Aires), VICENTE LÓPEZ, v. 84(2), p. 253-261, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572015000200001&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 13 ago. 2017.

ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **J Toxicol Environ Health**, v. 48(1) p.1-34,1996.

SANTOS, J. F. DOS; SOUSA, C. DA S.; SOARES, A. C. F.; LIMA, F. DE S.; BARBOSA, D. H. S. G. ACTINOBACTERIA AND ORGANIC FERTILIZERS FOR MANAGEMENT OF THE NEMATODE *Scutellonema bradys* IN YAM PLANTS. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29(3), p. 548-558, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-21252016000300548&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n304rc>.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221, 2009.

SHARMA, V.; SALWAN, R. Chapter 6 - Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture, In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, edited by Bhim Pratap Singh, Vijai Kumar Gupta and Ajit Kumar Passari, **Elsevier**, p. 93-108, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0>>. Acesso em: 09 mai. 2017.

SCHÖNEBERG, T.; MUSA, T.; FORRER, H.-R.; MASCHER, F.; BUCHELI, T. D.; BERTOSSA, M.; KELLER, B.; VOGELGSANG, S. Infection conditions of *Fusarium graminearum* in barley are variety specific and different from those in wheat. **European Journal of Plant Pathology**. Springer Netherlands, p. 1-15, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1434-7>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

SILVA, S. R.; BASSOI, M. C.; FOLONI, J. S. S. Informações técnicas para trigo e triticales – safra 2017 / **X Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales**; Brasília, DF, Embrapa, 2017.

SILVA, V. M. **Potencial antagônico de actinobactérias, visando o biocontrole de *botrytis cinerea* patógeno de *eucalyptus* sp.** 38 f. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SOUZA, R. G. de. Análise Mensal, Trigo, abril-2018. COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/17575_4c2bc146628d174eec28a9a24959ee68>. Acesso em 28 mai. 2018.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; GUARIENTI, E. M. NICOLAU, M. Distribution of *Fusarium* mycotoxins in wheat milling process. **Food Control**, v. 53, p. 91-95, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S.; CORRÊA, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445–450, 2016a.

TRALAMAZZA, S. M.; BRAGHINI, R.; CORRÊA, B. Trichothecene Genotypes of the *Fusarium graminearum* Species Complex Isolated from Brazilian Wheat Grains by Conventional and Quantitative PCR. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 246, p. 1-7, 01 Mar. 2016b.

VARGA, E.; WIESENBERGER, G.; HAMETNER, C.; WARD, T.J.; DONG, Y.; SCHÖFBECK, D.; MCCORMICK, S.; BROZ, K.; STÜCKLER, R.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R.; KISTLER, H.C.; BERTHILLER, F.; ADAM, G. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environ Microbiol**, v.17(8): p.2588-600, 2015.

VEGA-HERRERA, M. et al. CONFIRMATION OF DEOXYNIVALENOL PRESENCE IN CHILEAN WHEAT BY HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. **J. Chil. Chem. Soc.**, Concepción, v. 62, n. 2, p. 3435-3437, jun. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072017000200003&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 01 ago. 2017.

WARD, T. J.; BIELAWSKI, J. P.; KISTLER, H. C.; SULLIVAN, E.; O'DONNELL, K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99(14), p. 9278–9283, 2002. Disponível em: <<http://doi.org/10.1073/pnas.142307199>> Acesso em: 18 jun. 2018.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; SUGITHA, T. C. K.; SINGH, B. P.; SAXENA, A. K.; DHALIWAL, H. S. Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications. In: SINGH, B. P.; GUPTA, V.K.; Passari, A. K. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Chennai, India: MPS Limited, p. 13-41, 2018.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; CHEN, Q.; GUAN, T. LINDSTRÖM, K. AO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, X. The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial Properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94(5), p. 1321–1335, 2012.